

Caractérisation de mutants au cours  
de l'interaction  
*Botrytis-Arabidopsis* en fonction de la  
nature de la source azotée  
( $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_4^+$ )

KÉVIN FLOCH

M2 BIOLOGIE VÉGÉTALE  
SEMEANCES ET PLANTS

MARIE-CHRISTINE SOULIÉ & MATHILDE FAGARD  
ÉQUIPE NITROGEN-PATHOGEN INTERACTION (NPI)

# CONTEXTE

## Azote

Nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) et ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) → intrant



Wiki Commons

## Agents pathogènes

→ Impact sur les plantes



Agrimoroc.ma

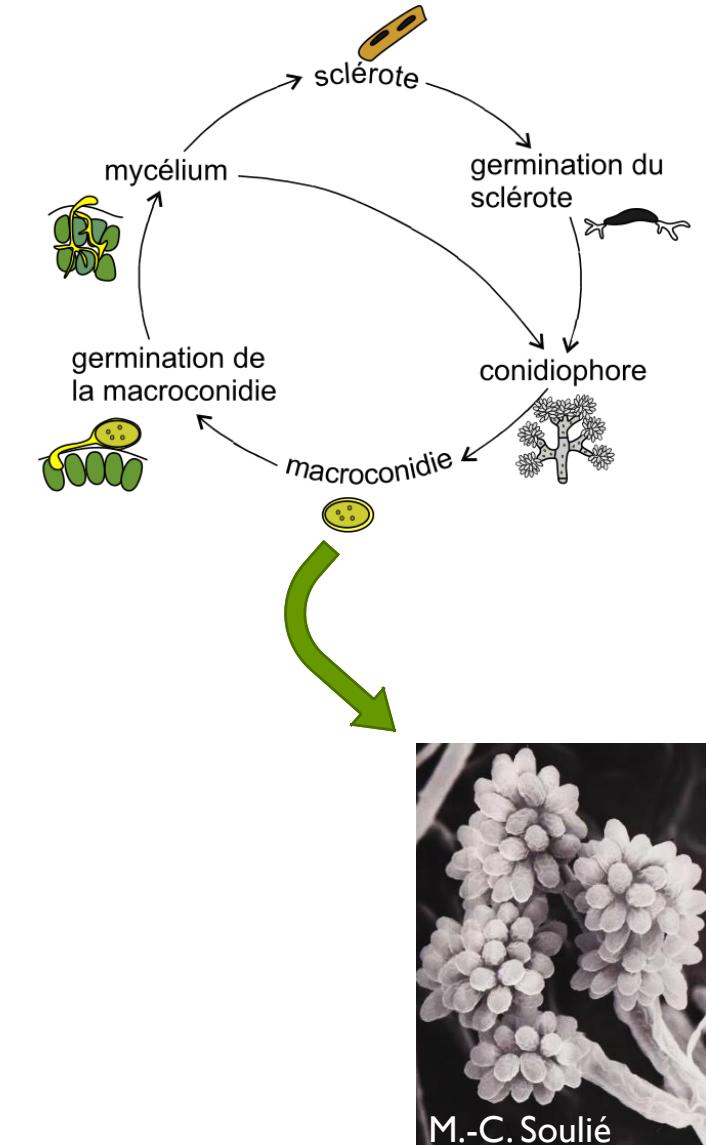


Azote → Incidence sur les maladies → Mécanismes sous-jacents ?

# CONTEXTE

- *B. cinerea* → champignon phytopathogène polyphage

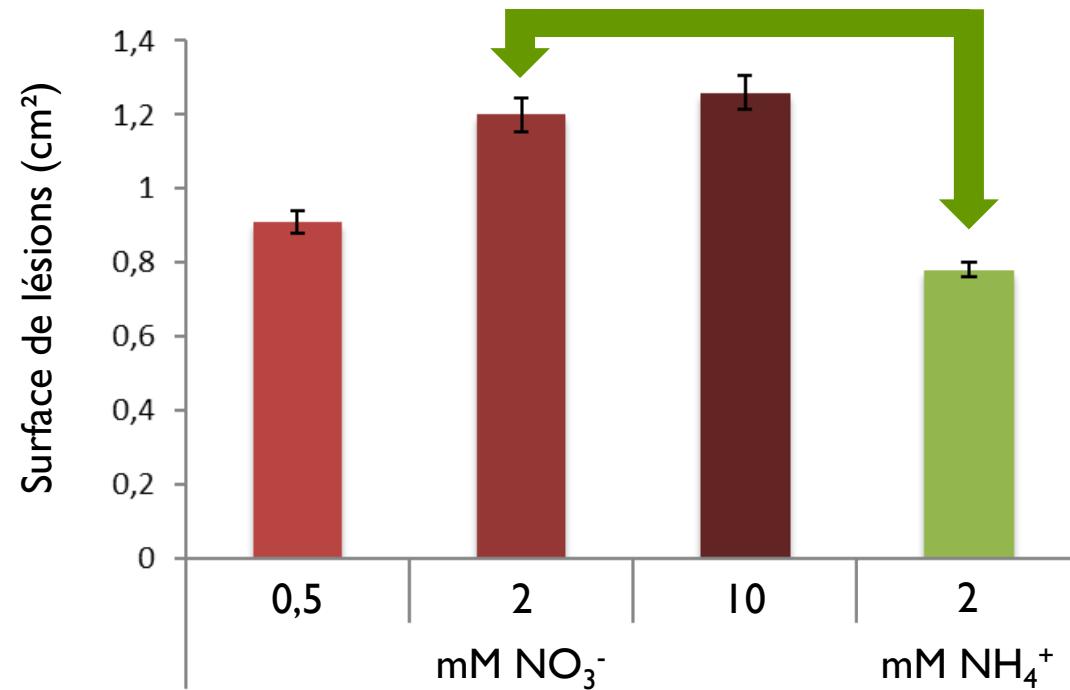
- Pourriture grise



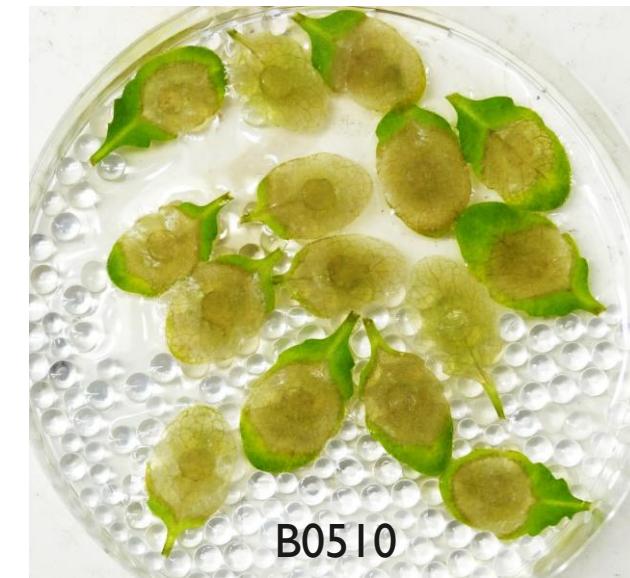
- Champignon modèle → facteurs de pathogénicité et défenses décrites

# CONTEXTE

- Impact de l'azote sur l'interaction *A. thaliana*-*B. cinerea*



*B. cinerea* sur *A. thaliana* (Col-0)



# CONTEXTE

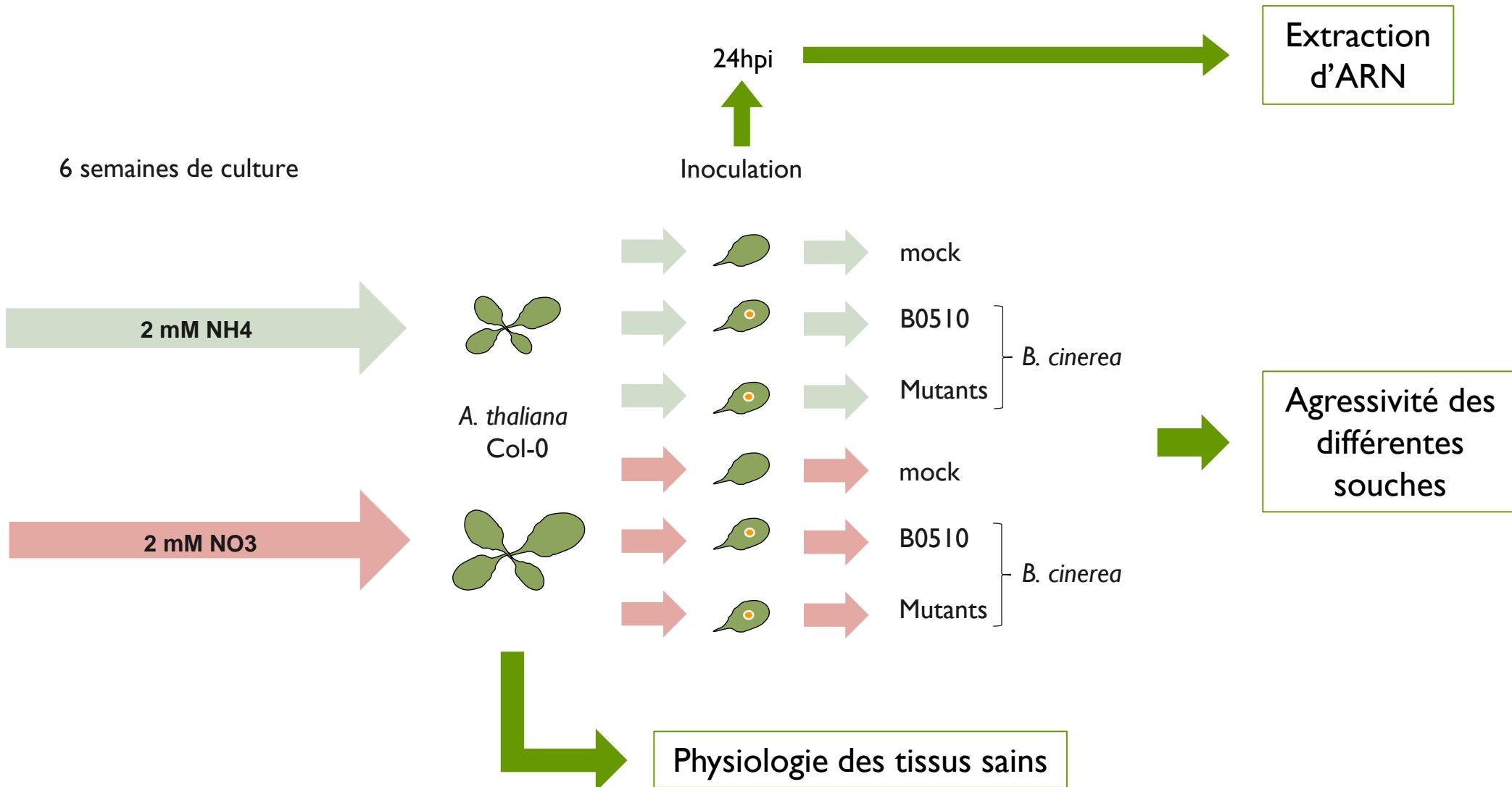
## Etudes antérieures

- Analyse du transcriptome (*A. thaliana* - *B. cinerea*) 6hpi → Gènes différentiellement exprimés en fonction  $[NO_3^-]$
  - *A. thaliana* :
    - 182 gènes différentiellement exprimés
  - *B. cinerea* :
    - 22 gènes différentiellement exprimés
    - Aussi différentiellement exprimés en  $NH_4^+$
- 
- *MS* → métabolite 2<sup>nd</sup>
  - *ACPI* → protéase acide
  - *BOT2* → toxine (botrydial)

## Objectifs du projet : 3 mutants de *B. cinerea* affectés dans les 3 gènes sélectionnés

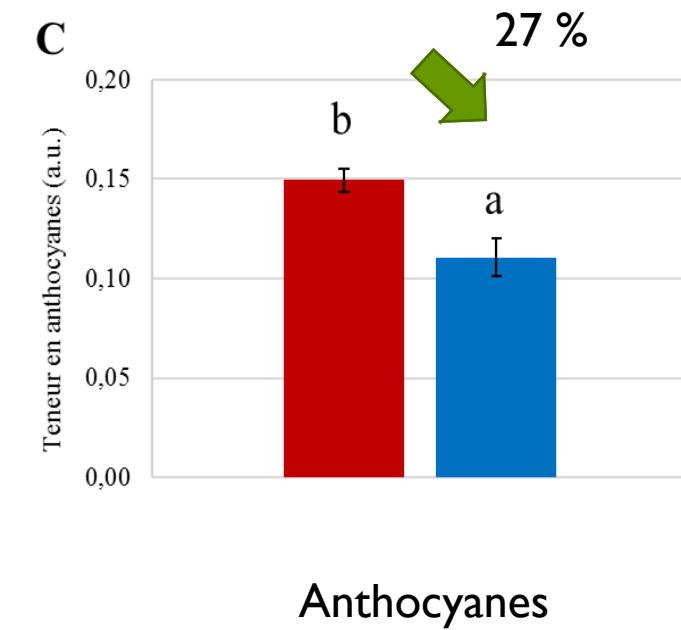
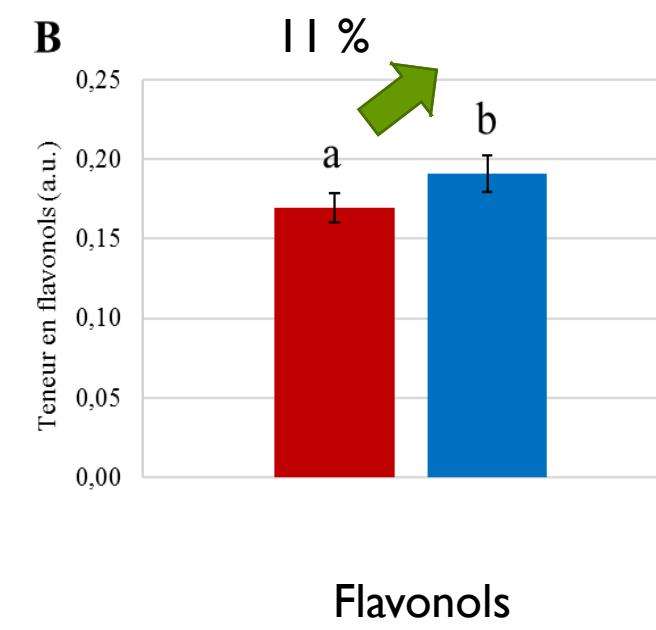
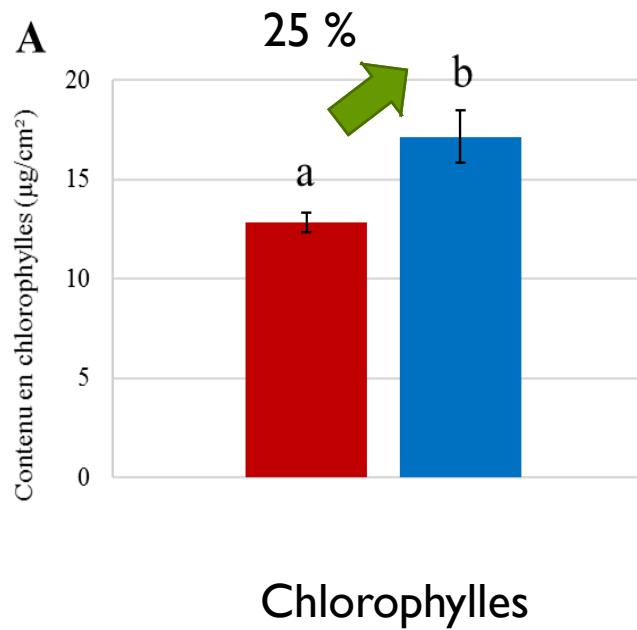
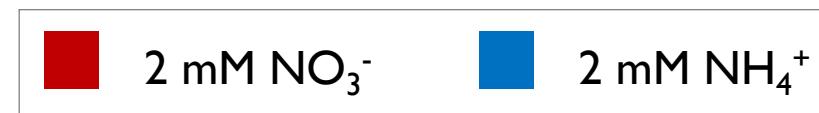
- Impliqués dans la pathogénicité de *B. cinerea* ?
- Expliquent la différence de symptômes en  $NO_3^-$  ou  $NH_4^+$  ?
- Expression différente des gènes (pathogénicité et défense) en  $NH_4^+$  ?

# INTERACTION *A. THALIANA* - *B. CINEREA*



# PHYSIOLOGIE DE LA PLANTE (Dualex®)

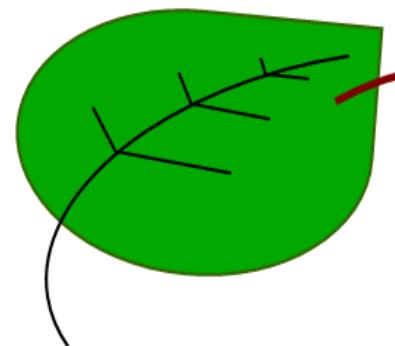
- Effet de la source azotée sur la teneur de différents composés de la plante ?



# PHYSIOLOGIE DE LA PLANTE

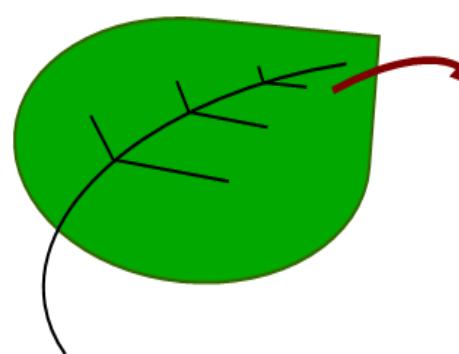
(Dosage  $\text{NO}_3^-$  et  $\text{NH}_4^+$ )

➤ Quelle est la quantité de  $\text{NH}_4^+$  et  $\text{NO}_3^-$  disponibles dans les tissus sains ?



2 mM  $\text{NO}_3^-$

→ 182,3 nmol  $\text{NO}_3^-$ /mg MF  
→ 2,5 nmol  $\text{NH}_4^+$ /mg MF



2 mM  $\text{NH}_4^+$

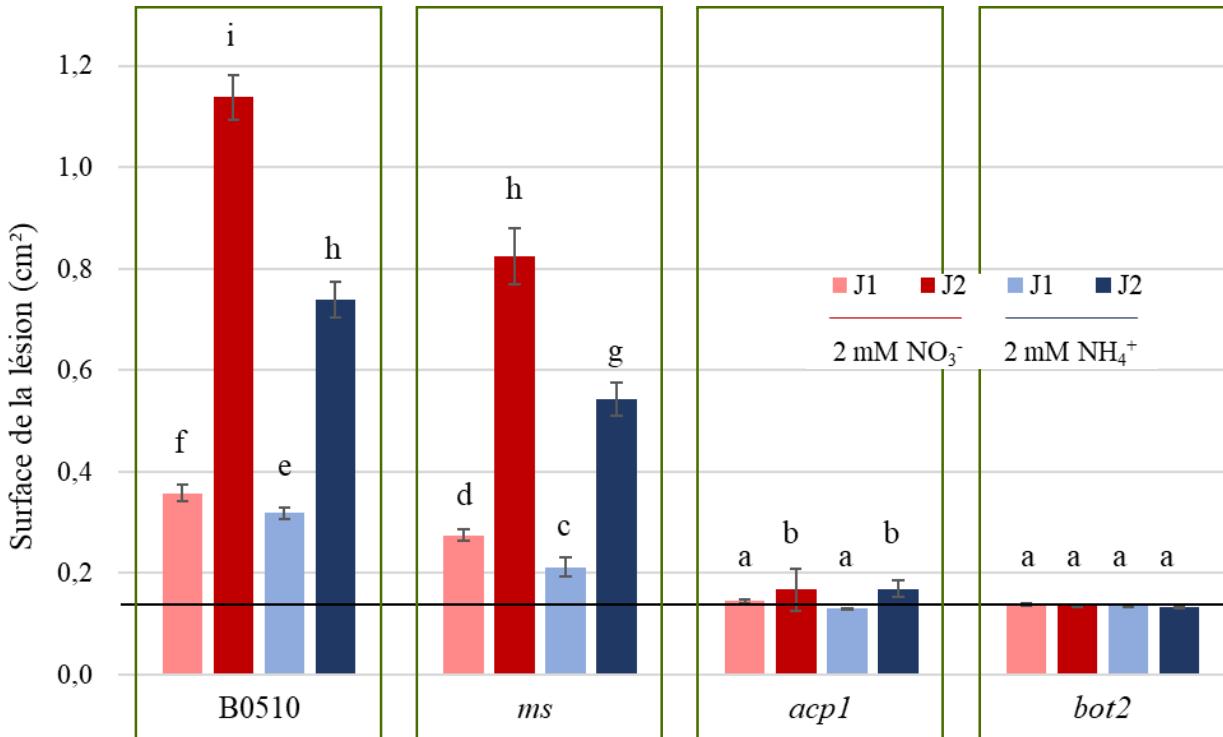
→ 66,1 nmol  $\text{NO}_3^-$ /mg MF  
→ 5,4 nmol  $\text{NH}_4^+$ /mg MF

- Concentrations en *in vitro* → pas d'effet sur la croissance de *B. cinerea*

# RÉSULTATS

(Pouvoir pathogène)

## ➤ Analyse de l'agressivité de B0510 et des mutants *ms*, *acp1* et *bot2* sur *A. thaliana* Col-0

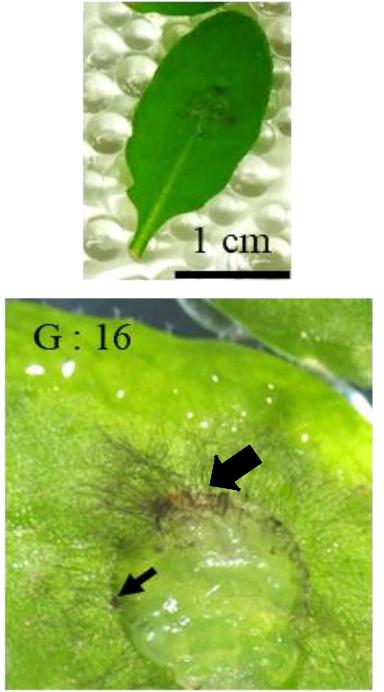
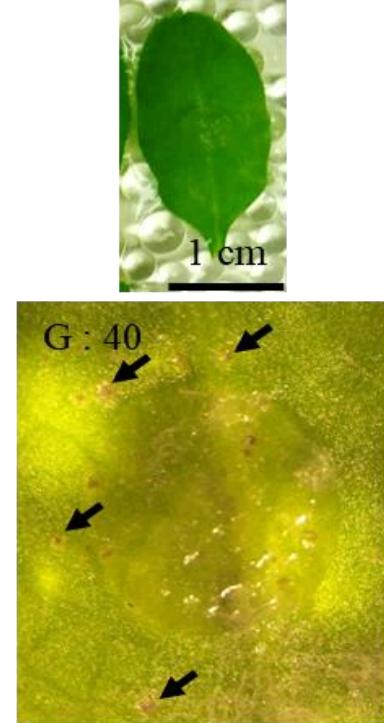


- *A. thaliana* plus tolérant à *B. cinerea* en ammonium
- MS participe à l'agressivité de *B. cinerea*
- *ACP1* et *BOT2* contribuent à la pathogénicité de *B. cinerea*

# RÉSULTATS

(Pouvoir pathogène)

## ➤ Analyse des symptômes de la souche sauvage et des mutants (48 hpi)

Souches de <i>B. cinerea</i>	B0510	<i>ms</i>	<i>acp1</i>	<i>bot2</i>
2 mM $\text{NO}_3^-$				

B0510 → macération tissulaire

*ms* → macération tissulaire plus faible

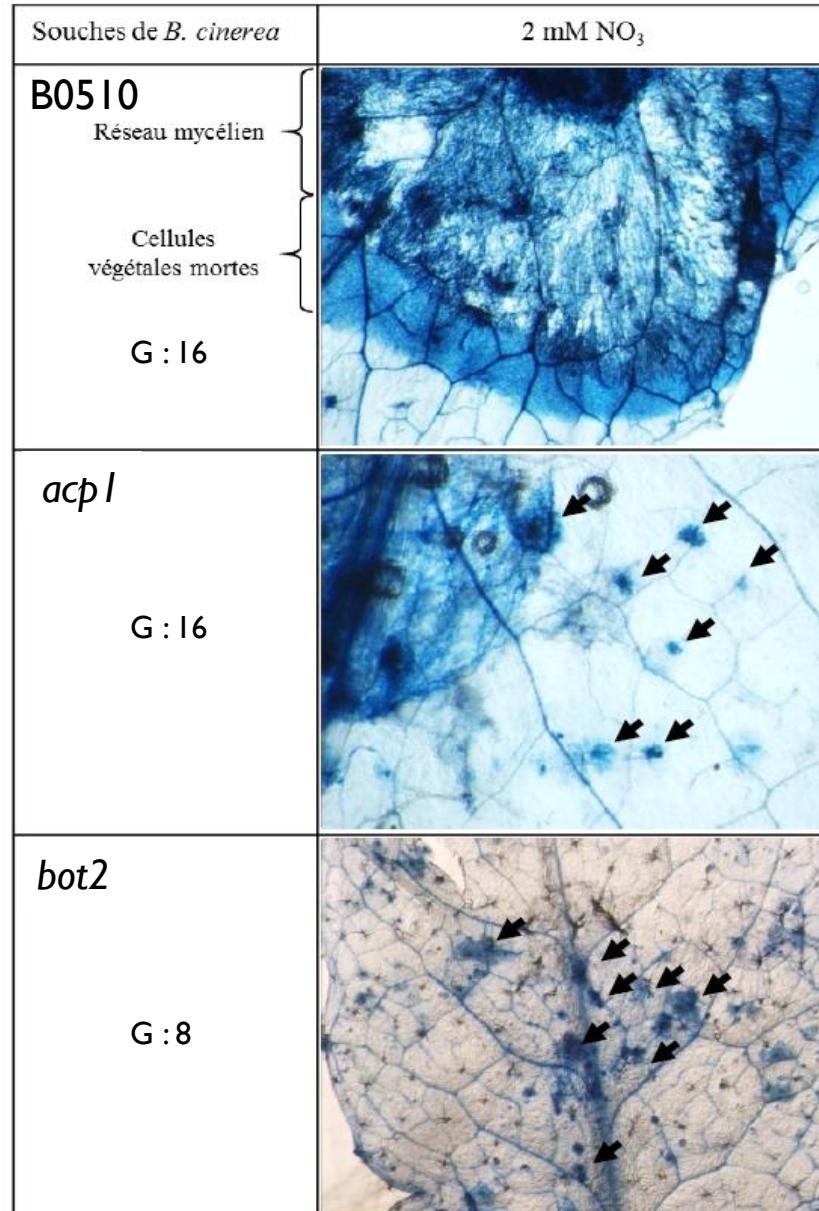
*acp1* → points nécrotiques

*bot2* → points nécrotiques

# RÉSULTATS

(symptômes des différentes souches)

- Analyse de la coloration au bleu de trypan



B0510 → mycélium dans les tissus

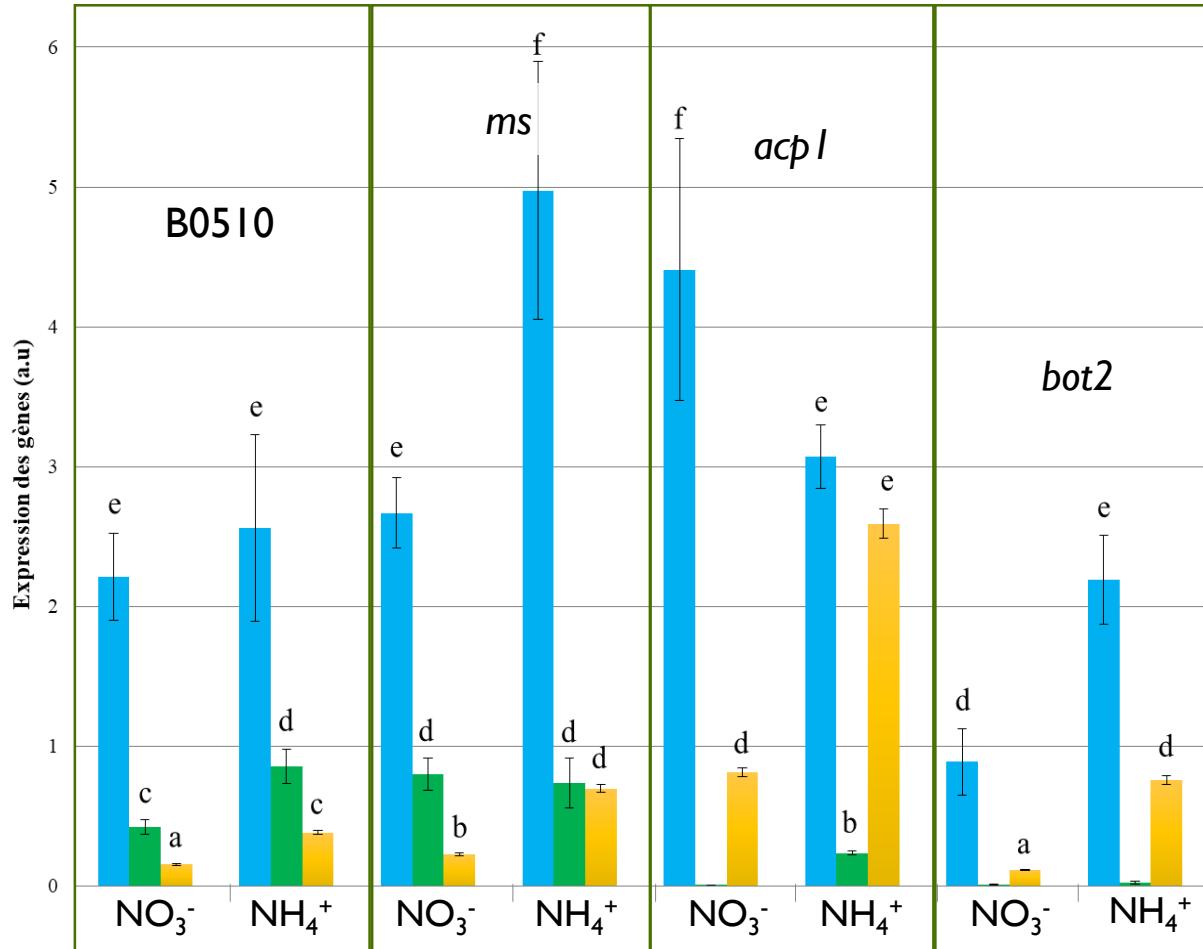
acp1 → points nécrotiques

bot2 → points nécrotiques

# RÉSULTATS

(PCR quantitative – *B. cinerea*)

## ➤ Expression des gènes de *B. cinerea in planta* (24 hpi)

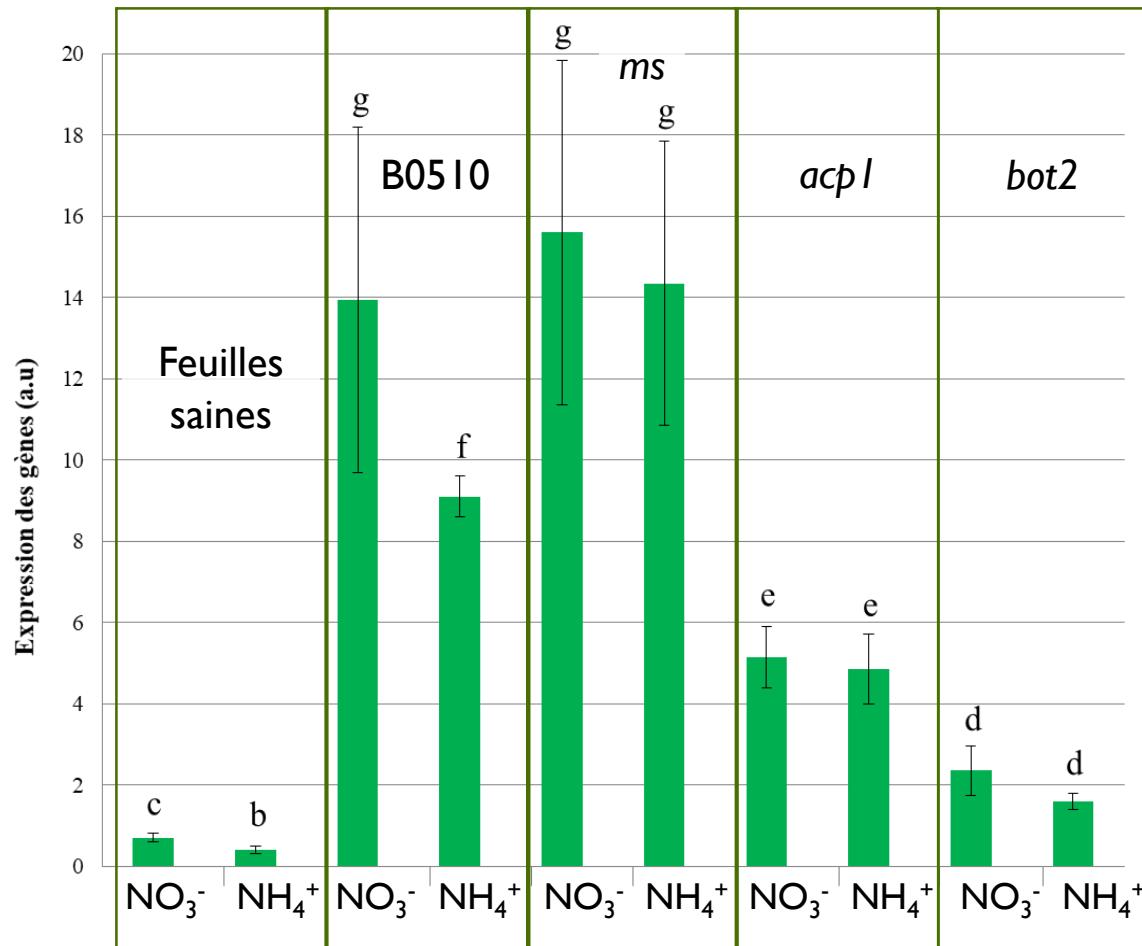


- **PGI** : gène le plus fortement exprimé
- **MS** : pas d'expression → expression à un temps plus court
- **ACPI** : faible expression
- **BOT2** : expression toujours plus importante en ammonium

# RÉSULTATS

(PCR quantitative – *A. thaliana*)

➤ Expression des gènes d'*A. thaliana* infecté par *B. cinerea* (B0510 et mutants) (24 hpi)



- ***PDF1.2a*** : gène le plus fortement exprimé après infection

# CONCLUSION

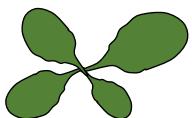
- **NH4+** : Meilleure tolérance de *A. thaliana* en ammonium vis-à-vis de B0510 et des mutants
- **Mutants :**
  - Mutant *ms* : baisse d'agressivité
    - Pas de baisse d'expression des gènes de pathogénicité testés
    - Pas d'augmentation des défenses testées
    - Augmentation de l'expression de *PG1* en ammonium → rôle dans l'activation des défenses ?
  - Mutant *acp1* : très forte baisse d'agressivité
    - Quasiment le même raisonnement qu'avec le mutant *ms*
    - Forte expression de *BOT2* en ammonium
  - Mutant *bot2* : non pathogène
    - Mais pathogène sur haricot (Dalmais et al., 2011) → spécificité d'hôte ?

# PERSPECTIVES

- Expression d'autres gènes de pathogénicité ?
  - Analyser l'expression d'autres gènes de pathogénicité connus (PMEs, PLs) chez *B. cinerea* qui pourraient expliquer la réduction d'agressivité des mutants *ms* et *acp1*
- A quel stade du processus infectieux les mutants sont-ils affectés ?
  - Analyse microscopique des mutants *acp1* et *bot2*  
➔ Mutant de pénétration ou de colonisation ?
- Tester d'autres plantes hôtes (spécificité d'hôte)



- Expression d'autres défenses?
  - Tester d'autres gènes de défense connus (PAD3, LOX2...) chez *A. thaliana*
  - Lignées PAD3-GUS → tester localement
  - ROS, Callose en microscopie
- Etudier le comportement des mutants d'*A. thaliana* délétés au niveau des gènes de défense



Marie-Christine Soulié & Mathilde Fagard

Membres de l'équipe NPI

Bâtiment 3 & IJPB



MERCI DE VOTRE ATTENTION